

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61D 19/00

C12N 15/00



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03109426.0

[45] 授权公告日 2005 年 12 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1232231C

[22] 申请日 2003.4.10 [21] 申请号 03109426.0

[71] 专利权人 李喜和

地址 300061 天津市河西区黑牛城道谊城小区 9-5-601

[72] 发明人 李喜和

审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 天津市杰盈专利代理有限公司

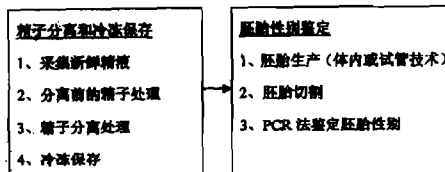
代理人 赵 敬

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 3 页

[54] 发明名称 以精子分离、胚胎性别鉴定为基础的家畜性别控制方法

## [57] 摘要

本发明涉及一种以精子分离、胚胎性别鉴定为基础的家畜性别控制方法，包括精子分离和冷冻保存，生产性别控制胚胎和胚胎性别鉴定步骤，其中精子分离和冷冻保存包括采集新鲜精液、分离前的精子处理、精子分离处理、冷冻保存；生产性别控制胚胎和胚胎性别鉴定步骤包括胚胎生产（体内或试管技术）、胚胎切割、PCR 法鉴定胚胎性别。本发明具有以下优点：分离精子的准确率达 90% 以上，精子活力保持在 50% 以上，胚胎的性别鉴定准确率约为 100%。



ISSN 1008-4274

1、一种以精子分离、胚胎性别鉴定为基础的家畜性别控制方法，其特征在于：包括以下步骤：

(1) 精子分离和冷冻保存：

A、从家畜体中采取新鲜精液 1 毫升，用磷酸缓冲液 PBS-0.05%PVP 离心洗涤 2 次，2000 转，5 分钟，然后用所述的磷酸缓冲液把精子浓度调至  $100 \times 10^6$  个/毫升，每毫升新鲜精液可调制 10-15 毫升上述浓度的稀释精液；

B、在精液中添加 10 微克/毫升荧光染色剂，在  $37^{\circ}\text{C}$  的条件下 DNA 染色 30 分钟，然后用磷酸缓冲液 PBS-0.05%PVP 离心洗涤 2 次，2000 转，5 分钟；

C、重新把精子浓度调至  $100 \times 10^6$  个/毫升，然后装入流式细胞分离机内，以每秒钟 3000 个精子的速度进行分离，分开后的 X 精子和 Y 精子被回收后，按照每支 250-500 万个精子的总数，装入 0.25 毫升精液冷冻管，制成冷冻精液，保存于液化氮内，1 毫升新鲜家畜精液生产上述分离后的 X 精子或 Y 精子的冷冻精液各 10-15 支；

D、生产性别控制胚胎：把分离后的精子以每支 200 个卵子的比例进行体外受精和培养，生产 25-30 个经过性别控制的 A-B 等级胚胎，冷冻保存，用于胚胎移植；

(2) 胚胎性别鉴定：

A、使用上述的冷冻胚胎；

B、胚胎细胞的切割：取解冻后的胚胎在所述的磷酸缓冲液加 0.25% 的蛋白酶中处理 2-3 分钟，使胚胎的透明带软化，然后移入所述的磷酸缓冲液加 0.3% 的血清蛋白溶液中，每次处理胚胎数 20-40 个左右；

C、在显微镜下，用金属刀片或玻璃细针切下胚胎的营养层细胞 10-15 个，把切下的细胞和胚胎的主要部分，包括内胚团细胞，分

别对应编号，胚胎的主要部分放入胚胎保存液 TCM199-10%FBS 中，在 CO<sub>2</sub> 培养箱中保留 2-4 小时；

D、以一种 DNA 体外合成技术 PCR 法对切下的细胞进行雌、雄性别鉴定，切取的每个胚胎细胞样品移入 10 微升纯水的 PCR 反应管中，水中快速清洗 3 次，以 100℃的水浴处理 10 分钟，然后取 1 微升进行 PCR 反应，以 BOV97M 为雄性探针，以  $\alpha$ -乳清蛋白基因片段为雌性样品探针；

PCR 反应液的组成：200 微摩尔的脱氧核苷酸、各 40 微摩尔的雄性和雌性样品探针模板、1.25 国际单位的 DNA 聚合酶、PCR 缓冲液，用纯水将总液量调至 50 微升；

PCR 反应的条件：95℃ 1 分钟、55℃ 2 分钟、72℃ 3 分钟，上述条件重复 40 次；

PCR 反应样品检查：取反应后的每个样品以 3%的琼脂糖电泳 20 分钟，具有 157bp,109bp 双带的胚胎为雄性，只有 109bp 带的胚胎为雌性，没有带的为样品操作失误或丢失。

2、根据权利要求 1 所述的一种以精子分离、胚胎性别鉴定为基础的家畜性别控制方法，其特征在于：所说的荧光染色剂为 Hoechst 33342。

## 以精子分离、胚胎性别鉴定为基础的家畜性别控制方法

### 技术领域

本发明属于一种家畜性别控制方法，特别涉及一种以精子分离、胚胎性别鉴定为基础的家畜性别控制方法。

### 背景技术

哺乳动物（含家畜）的性别由受精时精液中的 X 和 Y 精子来决定。X 精子和卵子结合产生母性个体，Y 精子则导致雄性个体的发生。在正常家畜精液中由于 X 精子和 Y 精子的比例相当，因此产生后代中的雌雄约各占 50%。对于实际产业经营来说，如果能够把 X 精子和 Y 精子分开，就可以根据生产需要选择家畜的性别，比如肉牛繁殖者要求尽可能提高雄性牛犊的出生率，而奶牛经营者则认为多生母牛犊可以获取更大的经济效益。

自从上世纪六十年代人工授精技术的普及应用，以及七十年代开始的胚胎移植技术的尝试，众多研究人员开始进行精子分离和胚胎性别鉴定的研究探讨。精子分离的基础是利用 X 精子和 Y 精子之间的理化、生理、遗传基因等方面的差异，比如重量、表面电荷、PH 值以及抗原性等来设计各种实验模型，其中包括沉淀法、密度梯度离心法、电泳法、抗原抗体法等。但是上述诸方法由于分离精子的准确率差或者完全没有效果，对精子活力的损害等原因，到上世纪九十年代基本上被大多数研究人员的实验结果所否定，因此也就无法作为一项实用技术应用到生产实践。另外，胚胎的性别鉴定也是类似情况。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种以精子分离、胚胎性别鉴定为基础的家畜性别控制方法，它克服了上述的缺陷，以 X 精子和 Y 精子 DNA 含量的微小差别为基础的流式细胞分离法的准确率为 90%，以人工授精

为主的精子活力为 50%，达到了产业应用水平；以 Y 精子特异性 DNA 片断为主的胚胎性别鉴定技术准确率接近 100%。

本发明以精子分离、胚胎性别鉴定为基础的家畜性别控制方法，包括以下步骤：

(1) 精子分离和冷冻保存

A、从家畜体中采取新鲜精液 1 毫升，用磷酸缓冲液 PBS-0.05%PVP，离心洗涤 2 次，2000 转，5 分钟，然后用所述的磷酸缓冲液把精子浓度调至  $100 \times 10^6$  个/毫升，每毫升新鲜精液可调制 10-15 毫升上述浓度的稀释精液。

B、在精液中添加 10 微克/毫升荧光染色剂，在 37℃ 的条件下 DNA 染色 30 分钟，然后用磷酸缓冲液 PBS-0.05%PVP，离心洗涤 2 次，2000 转，5 分钟；

C、重新把精子浓度调至  $100 \times 10^6$  个/毫升，然后装入流式细胞分离机内，以每秒钟 3000 个精子的速度进行分离，分开后的 X 精子和 Y 精子被回收后，按照每支 250~500 万个精子的总数，装入 0.25 毫升精液冷冻管，按照常规方法制成冷冻精液，保存于液化氮内，1 毫升新鲜精液可以生产上述分离后的 X 精子或 Y 精子的冷冻精液各 10-15 支；

D、生产性别控制胚胎：把分离后的精子以每支 200 个卵子的比例进行体外授精和培养，可以生产 25-30 个经过性别控制的 A-B 等级胚胎（囊胚），用于胚胎移植；

(2)、胚胎性别鉴定：

A、以使用冷冻胚胎为主；

B、胚胎细胞切割：取解冻后的囊胚，在所述的磷酸缓冲液加 0.25% 的蛋白酶中处理 2-3 分钟，使胚胎的透明带软化，然后移入所述的磷酸缓冲液加 0.3% 的血清蛋白溶液中，每次处理胚胎数 20-40 个左右；

C、在显微镜下，用刀端呈 15° 角，胚胎切割专用的金属刀片，或玻璃细针切下胚胎的营养层细胞 10-15 个，把切下的细胞和胚胎的主要部分，包括内胚团细胞，分别对应编号，胚胎的主要部分放入胚胎保存液 TCM199-10%FBS 中，在 CO<sub>2</sub> 培养箱中保留 2-4 小时；

D、以一种 DNA 体外合成技术 PCR 法对切下的细胞进行雌、雄性别鉴定，切取的每个胚胎细胞样品移入 10 微升纯水的 PCR 反应管中，水中快速清洗 3 次，以 100℃ 的水浴处理 10 分钟，然后取 1 微升进行 PCR 反应，以 BOV97M (157bp，一种雄性牛的 Y 染色体的特异性基因断片) 为雄性探针，以 α-乳清蛋白基因片段 (109bp) 为雌性样品探针；

PCR 反应液的组成：200 微摩尔的脱氧核苷酸、各 40 微摩尔的雄性和雌性样品探针模板、1.25 国际单位的 DNA 聚合酶(1.25Iu Taq 聚合酶)、PCR 缓冲液，用纯水将总液量调至 50 微升；

PCR 反应的条件：95℃ 1 分钟、55℃ 2 分钟、72℃ 3 分钟，上述条件重复 40 次；

PCR 反应样品检查：取反应后的每个样品，以 3% 的琼脂糖电泳 20 分钟，具有 157bp, 109bp 双带的胚胎为雄性，只有 109bp 带的胚胎为雌性，没有带的为样品操作失误或丢失。

根据 PCR 的检查结果，就可以确定对应胚胎的性别，然后根据需要把胚胎进行移植或冷冻保存。此技术过程约需 2-3 小时，样品的处理可以重叠进行，胚胎的性别鉴定准确率约为 100%。

所说的荧光染色剂为 Hoechst 33342。

本发明具有以下优点：分离精子的准确率达 90% 以上，精子活力保持在 50% 以上，胚胎的性别鉴定准确率约为 100%。

附图说明：

附图 1 是本发明工艺方法流程图。

附图 2 是胚胎切割模型图和胚胎实际切割图。

附图 3 是本发明染色体检查确认 PCR 结果图。

**具体实施方式:**

如图所示:一种以精子分离、胚胎性别鉴定为基础的家畜性别控制方法,包括以下步骤:

**(1) 精子分离和冷冻保存:**

A、从正常种公牛采取新鲜精液 1 毫升,用磷酸缓冲液 PBS-0.05%PVP,离心洗涤 2 次,2000 转,5 分钟,然后用所述的磷酸缓冲液把精子浓度调至  $100 \times 10^6$  个/毫升,每毫升新鲜精液可调制 10-15 毫升上述浓度的稀释精液;

B、在精子液中添加 10 微克/毫升荧光染色剂 Hoechst 33342,在 37℃ 的条件下 DNA 染色 30 分钟,然后用磷酸缓冲液 PBS-0.05%PVP 离心洗涤 2 次,2000 转,5 分钟;

C、重新把精子浓度调至  $100 \times 10^6$  个/毫升,然后装入流式细胞分离机内,以每秒钟 3000 个精子的速度进行分离,分开后的 X 精子带正电和 Y 精子带负电分别被回收后,按照每支 250~500 万个精子的总数,装入 0.25 毫升精液冷冻管,按照常规方法制成冷冻精液,保存于液化氮内,1 毫升新鲜精液可以生产上述分离后的 X 精子或 Y 精子的冷冻精液各 10-15 支;

D、生产性别控制胚胎:由于胚胎的性别由受精时的精子型决定,因此利用分离后的 X 精子或 Y 精子直接生产试管胚胎,扩大分离精子的使用效率,具体方法是把分离后的精子以每支 200 个卵子的比例进行体外受精和培养,可以生产 25-30 个经过性别控制的 A-B 等级胚胎(囊胚),冷冻保存,用于胚胎移植;

**(2)、胚胎性别鉴定:**

A、胚胎性别鉴定以使用冷冻胚胎为主;

B、胚胎细胞切割:取解冻后的囊胚在所述的磷酸缓冲液加 0.25%的蛋白酶中处理 2-3 分钟,使胚胎的透明带软化,然后移入所述的磷酸缓冲液加 0.3%的血清蛋白溶液中,每次处理胚胎数 20-40

个左右;

C、在显微镜下,用刀端呈 15° 角,胚胎切割专用的金属刀片切下胚胎的营养层细胞 10-15 个,把切下的细胞和胚胎的主要部分,包括内胚团细胞,分别对应编号,胚胎的主要部分放入胚胎保存液 TCM199-10%FBS 中,在 CO<sub>2</sub> 培养箱中保留 2-4 小时;

D、以一种 DNA 体外合成技术 PCR 法对切下的细胞进行雌、雄性别鉴定,切取的每个胚胎细胞样品移入 10 微升纯水的 PCR 反应管中,水中快速清洗 3 次,以 100℃ 的水浴处理 10 分钟,然后取 1 微升进行 PCR 反应;以 BOV97M (157bp, 一种雄性牛的 Y 染色体的特异性基因断片) 为雄性探针,以 α-乳清蛋白基因片段 (109bp) 为雌性样品探针;

PCR 反应液的组成: 200 微摩尔的脱氧核苷酸、各 40 微摩尔的雄性和雌性样品探针模板、1.25 国际单位的 DNA 聚合酶、PCR 缓冲液,用纯水将总液量调至 50 微升;

PCR 反应的条件: 95℃ 1 分钟、55℃ 2 分钟、72℃ 3 分钟,上述条件重复 40 次;

PCR 反应样品检查:取反应后的每个样品,以 3% 的琼脂糖电泳 20 分钟,具有 157bp,109bp 双带的胚胎为雄性,只有 109bp 带的胚胎为雌性,没有带的为样品操作失误或丢失。

根据 PCR 的检查结果,就可以确定对应胚胎的性别,然后根据需要把胚胎进行移植或冷冻保存。此技术过程约需 2-3 小时,样品的处理可以重叠进行,胚胎的性别鉴定准确率约为 100%。

检测结果:

本技术在实验室和产业中试水平上均进行了具体实施,并对其结果进行了不同层次的检测,具体方法和结果如下:(参见图 3)

#### 1、分离精子的准确率和受精性:

##### (1) 分离精子的准确率检查(原位分子杂交法)

检查精子总数：2000 个

X 精子样品（强荧光） X 精子 93.6% Y 精子 6.4%

Y 精子样品（弱荧光） Y 精子 81.8% X 精子 18.2%

(2) 利用分离精子受精后的产犊检查（显微受精胚胎）

Y 精子样品 10 头 雄性 8 头/雌性 2 头 准确率 80.0%

(3) 性别控制胚胎的生产和鉴定（PCR 法检查）

Y 精子样品：体外受精处理卵子 187 个，得到 A-B 囊胚 62 个  
(26.3%)，其中雄性胚胎占 86%

X 精子样品：体外受精处理卵子 235 个，得到 A-B 囊胚 79 个  
(36.6%)，其中雌性胚胎占 91%

2、性别鉴定胚胎的准确率检查：

检查胚胎数 46 个，其中雄性胚 24 个（52.1%），这些胚胎移植后  
产犊总数 15 头（受胎率 62.5%）：雄性 15 头（100%），雌性 0 头（0%）。

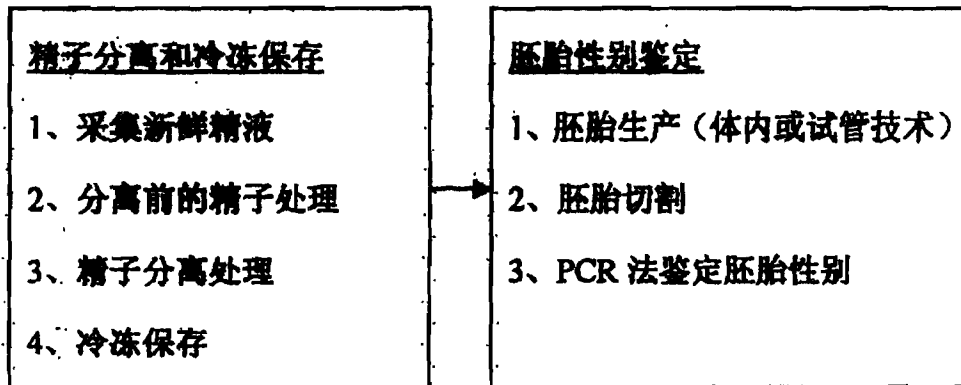
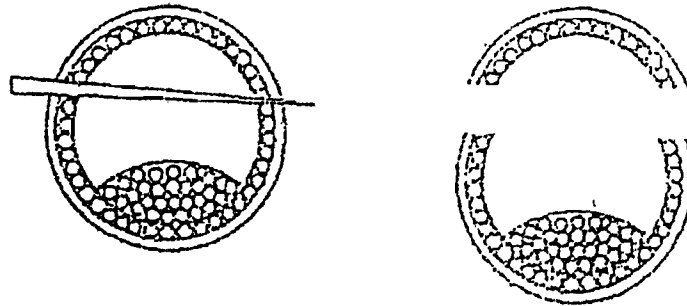
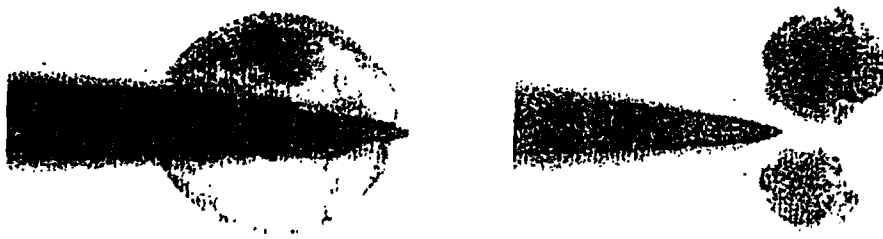


图 1

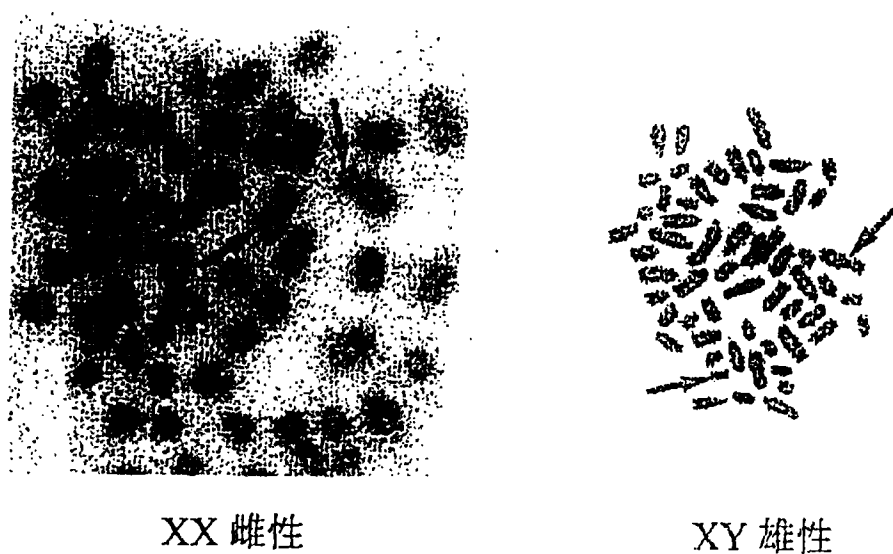


胚胎切割模型



胚胎实际切割

图 2



染色体检查确认 PCR 的结果

图 3